

СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ МОРСКИХ СВИНОК
НА ЛИЧИНОК И ЭКСТРАКТЫ ИЗ ЛИЧИНОК
ПОДКОЖНЫХ ОВОДОВ *OEDEMAGENA TARANDI* L.
И *HYPODERMA BOVIS* DE GEER

В. Н. Бисли и К. А. Бреев

Школа тропической медицины, Ливерпульский университет, Англия,
и Зоологический институт АН СССР, Ленинград

Методом двойной диффузии в геле по Ухтерлони показана видовая специфичность антигенов гемолимфы личинок III стадии *Oedemagena tarandi* L. и *Hypoderma bovis* De Geer. После однократной инъекции водно-солевого экстракта из 700 свежееотродившихся личинок I стадии *O. tarandi* сыворотка свинки не реагировала ни со специфичным антигеном, ни с антигенами гемолимфы личинок III стадии, что может быть объяснено слишком малым содержанием белка в экстракте.

Меньшая зараженность взрослых животных личинками подкожных оводов по сравнению с молодняком известна давно. Такие факты установлены для подкожных оводов крупного рогатого скота (Благовещенский и Померанцев, 1929; Благовещенский и Павловский, 1930; Курчиков, 1951a; Лутта, 1957; Ромашова, 1957), северного оленя (Бреев и Каразеева, 1953) и сурков (Грунин, 1958). Однако причины, обуславливающие это явление, остаются во многом неясными.

Естественно возникает мысль, что в результате повторных заражений оводами у животных вырабатывается иммунитет. В связи с этим предпринимались попытки создания искусственного иммунитета к оводовой инвазии. Но они либо окончились неудачей, либо дали очень нечеткие результаты (Sergent et Sergent, 1950; Khan, Connell a. Darcel, 1960).

В последнее время в связи с широким применением для борьбы с оводами системных фосфорорганических инсектицидов иммунитет изучается также и с точки зрения разработки методов иммуно-биологической диагностики заражения животных оводами в период развития личинок I стадии, когда внешние признаки инвазии еще отсутствуют (Бартнинкас, 1964; Nelson, 1963). Но и здесь пока не установлена степень специфичности предложенных методов.

Изучение иммунитета интересно еще и потому, что, как показал статистический анализ, существуют зависящие от плотности популяции паразита факторы, регулирующие средний уровень численности оводов, причем есть достаточные основания предполагать, что эти факторы связаны с хозяино-паразитными отношениями (Бреев, 1968).

При анализе цитированных работ по иммунитету обращает на себя внимание, что для приготовления антигенов обычно использовались разные биологические препараты, приготовленные из личинок II и III стадий, получить которых в достаточном количестве сравнительно просто. Но сейчас уже очевидно, что основная гибель личинок подкожных оводов, достигающая 70 и более процентов, происходит в самый начальный период их миграции в организме хозяина (Курчиков, 1951b; Бреев, 1961, 1967).

Все эти обстоятельства побудили нас, когда представилась возможность,¹ объединить опыт каждого, с одной стороны, в методах получения и воспитания в лабораторных условиях необходимого живого материала, а с другой — в применении иммунологических методов исследования и поставить ряд опытов с личинками разных видов подкожных оводов не только III, но и I стадии. Основной задачей работы было попытаться определить степень специфичности антигенов как у разных видов, так и у разных стадий развития одного и того же вида оводов, потому что решение этих вопросов важно для определения направления и методов дальнейших исследований иммунитета к этим паразитам. Общая концепция хозяино-паразитных отношений у подкожных оводов изложена в статье одного из авторов (Бисли, 1968).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Незрелые личинки *Oedemagena tarandi* L. были получены выдавливанием из оленей в опытном стаде Нарьян-Марской сельскохозяйственной опытной станции в конце июня—начале июля 1967 г. После сбора они помещались в небольших мешочках на лед в термосы (температура 3—5°), в которых и были доставлены через 2 недели после сбора в лабораторию, где хранились в холодильнике при 3°. Всего было собрано несколько сотен личинок. Незрелые личинки *Hypoderma bovis* De Geer были получены выдавливанием из коров в одном из пригородных совхозов Ленинграда и содержались в тех же условиях, что и личинки *O. tarandi*.

Для получения гемолимфы каждую личинку предварительно обмывали в водопроводной, а затем в стерильной дистиллированной воде и в растворах пенициллина и стрептомицина. Тщательно отмытую личинку в стерильных условиях надрезали ножницами у одного из концов тела и собирали свободно стекавшую гемолимфу через воронку в пробирку с завинчивающейся пробкой. Поскольку вместе с гемолимфой попадали и частицы жирового тела, каждую порцию, объемом примерно 5—8 мл, центрифугировали при 4000—5000 об./минуту в течение 5—10 минут, а затем отсасывали стерильной пипеткой жидкую прозрачную фракцию, собирали ее в сосуд с завинчивающейся или притертой пробкой и хранили до употребления в холодильнике при —5—10°. Содержание белка в пробе из собранной вместе гемолимфы личинок *O. tarandi*, определенное методом Лаури, составляло 21 мг/мл. Часть собранной гемолимфы личинок *O. tarandi* была подвергнута лиофильной сушке. Как показали опыты, полученный сухой препарат по антигенным свойствам не отличался от нативной гемолимфы. Неразбавленную гемолимфу вводили морским свинкам по 0.5 мл интраперитонеально 3 раза с интервалами 3 дня.

Личинки I стадии были получены следующим образом. Наряду с незрелыми было собрано около 150 зрелых, естественно выпавших из оленей личинок *O. tarandi* и около 100 выпавших из коров личинок *H. bovis*. Для этого на несколько сильно зараженных телят оленей надевались специальные рубашки, а у коров на желваки с личинками наклеивались колпачки. После сбора для предотвращения преждевременного окукливания личинки содержались при температуре 3—5°. В лаборатории в камерах политермостата все они окуклились. Куколки воспитывались при переменных температурах. Тепловой режим был подобран с таким расчетом, чтобы получить в заданный срок примерно в течение 20 дней более или менее равномерный выплод взрослых оводов.

Полученных таким способом самцов и самок спаривали по методике Вейнтрауба (Weintraub, 1961) с небольшой модификацией (Бреев и Дядечко, 1964). Оплодотворенные самки *O. tarandi* откладывали яйца на волоски оленьей шкуры, подогреваемой изнутри сосудом с горячей водой.

¹ Работа была выполнена в Лаборатории паразитологии Зоологического института АН СССР во время командировки В. Н. Бисли в Ленинград по соглашению обмена научными работниками между Лондонским Королевским Обществом и Академией наук Союза СССР.

Самки *H. bovis* в лабораторных условиях яиц не клали. Их вывозили в хозяйство и заставляли откладывать яйца на строго локализованный участок на теле теленка.

Все волоски с яйцами затем выщипывали и после предварительной наружной стерилизации облучением бактерицидной лампой в течение 35—40 минут инкубировали в стерильных чашках Петри при постоянных температурах в пределах от 20 до 36°.

Развитие яиц в каждом опыте контролировалось регулярными просмотрами небольшого количества их (по 1—2 яйца) под микроскопом в капельке гвоздичного масла. Когда в яйцах становились видны уже сформированные личинки, за ними устанавливались регулярные наблюдения через каждые 0.5—1 час. Всех выплывшихся личинок собирали кончиком стерильной кисточки или препаровальной иглы и переносили в пробирку со стерильным физиологическим раствором или использовали для имплантации морским свинкам. В последнем случае необходимое количество свинок подготавливали к моменту массового выплода личинок в одном из опытов — выбривали участок на спине в области грудной клетки и анестезировали внутривентральной инъекцией нембутала.

Используя ранее описанную методику (Beesley a. Davies, 1959), в области между лопатками свинки стерильно выщипывали небольшой подкожный карман, куда и помещали только что отродившихся личинок — от 20 до 64 при каждой имплантации. Разрез кожи, размером 8—10 мм, зашивали 1—2 швами и присыпали порошком стрептоцида. Послеоперационные нагноения были редки.

В одном опыте свинке интраперитонеально был введен водно-солевой экстракт из примерно 700 личинок I стадии *O. tarandi*, подвергнутых переменному замораживанию при —5— —10° и оттаиванию, что приводило к мацерации тканей и облегчало поступление содержимого тела личинки в физиологический раствор.

Кровь для получения антисыворотки брали у свинок сердечными пункциями первый раз через 10—14 дней после имплантации личинок или инъекции гемолимфы. В большинстве случаев были взяты и повторные пробы крови. Сыворотку хранили при —10°. Сопоставление антигена с антисывороткой производилось методом двойной диффузии в геле по Ухтерлони. В качестве антигенов были взяты гемолимфа личинок III стадии *O. tarandi* и *H. bovis* и водно-солевой экстракт из личинок I стадии *O. tarandi*.

Вскрытия и тщательный просмотр соединительной ткани свинок для обнаружения имплантированных личинок были произведены через разные интервалы времени — от 7 до 30 дней.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. *Oedemagena tarandi* L. а) И н ъ е к ц и и г е м о л и м ф ы л и ч и н о к III с т а д и и. Кровь была взята через 10, 26, 34 и 44 дня после последней инъекции гемолимфы. Кроме того, одной свинке через 16 дней после этой инъекции было имплантировано 20 личинок I стадии.

В опытах с сывороткой, полученной через 10—34 дня и сопоставлявшейся с гемолимфой *O. tarandi* и *H. bovis* в качестве антигенов, были получены в первом случае 3, во втором — 1 линия преципитации (см. рисунок), однако на 44-й день сыворотка реакции не дала. Аналогичная 1-линейная реакция с антисывороткой на гемолимфу *O. tarandi* была получена, когда в качестве антигена применялась гемолимфа личинок III стадии *H. bovis*, полученная в Ливерпуле от местной популяции этого вида.

Сыворотка крови свинки, которой не только была введена гемолимфа, но и имплантированы 20 личинок I стадии *O. tarandi* каких-либо отличий в реакции преципитации не показала. Сыворотка крови свинки, которой был инъецирован экстракт из 700 личинок I стадии *O. tarandi* не реагировала ни с гемолимфой личинок III стадии *O. tarandi* и *H. bovis*, ни с экстрактом из личинок I стадии *O. tarandi*.

б) Имплантация личинок I стадии. Пяти свинкам были имплантированы соответственно 20, 20, 25, 35 и 64 личинки. Никаких реакций преципитации у сыворотки крови этих животных не получено. При вскрытиях 4 личинки были найдены только у одной свинки, получившей за 7 дней до вскрытия 64 личинки. Все 4 были мертвыми и располагались поблизости от места имплантации.

2. *Hypoderma bovis* De Geer.

а) Инъекции гемолимфы личинок III стадии. Гемолимфа была введена двум свинкам, сыворотка крови которых была взята на 10-й, 21-й и 43-й день. Три четкие линии преципитации по отношению к антигену *H. bovis* и одна линия — к антигену *O. tarandi* были получены у всех проб сыворотки (см. рисунок).

б) Имплантация личинок I стадии. Четирем свинкам были имплантированы 22, 24, 37 и 50 личинок. Сыворотка крови, полученная от этих животных через 12 и 24 дня, не реагировала с гемолимфой личинок III стадии *H. bovis* и *O. tarandi*. При вскрытиях личинок обнаружить не удалось.

3. *Cephenomyia trompe* Modeer. Кроме личинок *O. tarandi*, от оленей были получены 10 незрелых личинок *C. trompe*. Гемолимфа этих личинок была введена интраперитонеально одной свинке по вышеуказанной методике (3 раза по 0.5 мл). Кровь была взята на 10-й, 19-й, 30-й и 51-й день после последней инъекции гемолимфы. Сыворотка крови ни в одном случае не дала реакции преципитации с антигенами гемолимфы личинок III стадии *C. trompe*, *H. bovis* и *O. tarandi*.

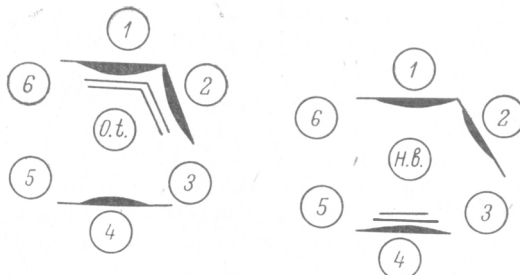


Схема реакций двойной диффузии в геле по Ухтерлони между гемолимфой личинок III стадии *O. tarandi* (*O. t.*) и *H. bovis* (*H. b.*) и сывороткой от морских свинок, которым была инъецирована та же гемолимфа или имплантированы личинки I стадии.

1—6 — сыворотка от морских свинок. 1 — введена гемолимфа личинок III стадии *O. tarandi*; 2 — то же, но кроме того имплантированы личинки I стадии *O. tarandi*; 3 — имплантированы личинки I стадии *O. tarandi*; 4 — введена гемолимфа личинок III стадии *H. bovis*; 5 — имплантированы личинки I стадии *H. bovis*; 6 — введена гемолимфа личинок III стадии *Cephenomyia trompe*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как уже было указано, начальный период жизни личинок I стадии является, вероятно, наиболее критическим периодом в жизненном цикле подкожных оводов. Многие личинки погибают еще до проникновения под кожу хозяина и лишь сравнительно немногие выживают до II стадии. Следовательно, нет ничего удивительного в том, что в наших опытах ни одна из имплантированных личинок не выжила. Сочетание случайных механических повреждений, возможных во время подготовки к имплантации, чувствительность личинок к высыханию и реакция тканей хозяина (особенно в случае необычного хозяина) были, по-видимому, слишком большими препятствиями для выживания.

Однако более взрослые личинки I стадии *H. lineatum* и *H. bovis*, полученные из пищеводов и позвоночного канала скота, оказались достаточно выносливыми, чтобы противостоять имплантации под кожу кроликов, где они выживали в течение многих недель (Beesley a. Davies, 1959). Эти личинки оказались не способны к линьке во II стадию, но они проделывали отверстие в коже, после чего выпадали наружу. При имплантации таких личинок телятам они хорошо приживались, переходя, в дальнейшем во II и III стадии (Beesley a. Davies, 1959).

Также сравнительно хорошо приживались и личинки, отрождавшиеся из яиц, при экспериментальном заражении крупного рогатого скота яйцами подкожных оводов (Weintraub, McGregor a. Brundrett, 1961; Бреев и Дядечко, 1964, 1965; Петров, 1966; Бреев, 1967). Различия между ус-

ловиями в этих работах и наших опытах заключаются в отсутствии каких-либо механических повреждений и наличии нормального хозяина, к жизни в тканях которого личинки адаптированы.

Результаты серологических опытов показывают, что антигены гемолимфы личинок III стадии *O. tarandi* и *H. bovis* имеют по крайней мере один общий компонент, а возможно и два остальных. В настоящее время уже проведено более детальное изучение различных антигенных фракций личинок оводов с использованием методов иммуно-электрофореза и его результаты вскоре будут опубликованы.

В то же время перекрестные реакции между гемолимфой *C. trompe* и антисывороткой к гемолимфе *O. tarandi* и *H. bovis* и, наоборот, никаких линий преципитации не дали. Таким образом, серологические данные подтверждают правильность выделения Груниным (1950) *Hypodermatidae* и *Oestridae* в самостоятельные семейства.

Отсутствие реакции преципитации между сывороткой свинок, которым вводилась гемолимфа личинок III стадии, и антигеном из личинок I стадии не дает еще нам права говорить о разнородности антигенных свойств личинок различных стадий развития, поскольку такая реакция отсутствовала и при сопоставлении этого антигена с сывороткой свинки, получившей инъекцию из экстракта личинок I стадии. Можно предполагать, что причиной отрицательного результата в данном случае было слишком малое количество белка: всего около 0.75 мг в экстракте из 700 личинок I стадии, который был введен свинке. Не большее, а скорее меньшее количество белка содержалось и в экстракте, использовавшемся в качестве антигена в пробе Ухтерлони. Для сравнения можно указать, что в гемолимфе, вводившейся свинкам для получения антисыворотки, было много больше белка: всего в трех дозах по 0.5 мл — около 31 мг.

Очевидно, для решения интересного вопроса о степени идентичности антигенов у личинок разных стадий развития нужно либо получить много большее количество личинок I стадии, либо применить иные, более чувствительные методы исследования.

Авторы искренне благодарны Дирекции Зоологического института АН СССР за предоставление возможности выполнения этой работы; ст. лаборанту А. Т. Кирьяковой и лаборанту Зоологического института В. З. Белинской за большую помощь в трудоемких опытах; Директору Нарьян-Марской сельскохозяйственной опытной станции, доктору сельскохозяйственных наук П. А. Рочеву и бригадиру опытного оленьего стада станция М. П. Вокуеву за предоставление возможности и помощь при сборе личинок оводов; ст. научному сотруднику Института цитологии АН СССР Н. М. Несветаевой за анализы содержания белка в исследуемых субстратах; ст. научному сотруднику Института сельскохозяйственной микробиологии ВАСХНИЛ А. Я. Лесковой за лиофильную сушку гемолимфы.

Л и т е р а т у р а

- Б а р т н и к а с И. И. 1964. Изучение иммунобиологической диагностики гастро-филёза и гиподерматоза. Автореф. дисс. на соискание уч. степени канд. вет. наук. Каунас : 1—27.
- Б и с л и В. Н. 1968. Хозяино-паразитные отношения при заражении крупного рогатого скота. Паразитол., 2 (3) : 202—208.
- Б л а г о в е щ е н с к и й Д. И. и П о м е р а н ц е в Б. И. 1929. Кожный овод (*H. bovis*) в Новгородском округе. Практическая ветеринария, 2 : 131—134.
- Б л а г о в е щ е н с к и й Д. И. и П а в л о в с к и й Е. Н. 1930. К биологии кожного овода (*H. bovis* De Geer) и мерам борьбы с ним. Изв. по практическ. энтомол., 4 (2) : 371—398.
- Б р е е в К. А. и К а р а з е е в а З. Ф. 1953. Материалы по биологии кожного овода (*Oedemagena tarandi*). II. Наблюдения над личинками II и III стадий. Паразитол. сб. ЗИН АН СССР, 15 : 410—424.
- Б р е е в К. А. 1961. Биологические основы борьбы с подкожными оводами. Энтомол. обзор., 40 (1) : 76—97.
- Б р е е в К. А. и Д я д е ч к о В. Н. 1964. Об искусственном заражении крупного рогатого скота яйцами подкожного овода *Hypoderma bovis*. Зоол. журн., 43 (3) : 474—479.

- Бреев К. А. и Дядечко В. Н. 1965. О путях миграции личинок I стадии подкожного овода (*H. bovis* De Geer) в организме хозяина. Зоол. журн., 44 (5) : 728—732.
- Бреев К. А. 1967. Новые данные о миграции личинок I стадии *H. bovis* De Geer в организме хозяина. Паразитол. сб. ЗИН АН СССР, 23 : 191—221.
- Бреев К. А. 1968. О распределении личинок подкожных оводов в стадах крупного рогатого скота. II. Экспонента k негативного биномиального распределения, как мера дисперсии заражения животных оводами. Паразитол., 2 (5) : 381—394.
- Грунин К. Я. 1950. Личинки I стадии Oestridae и Hypodermatidae и их значение для установления филогении. Паразитол. сб. ЗИН АН СССР, 12 : 225—268.
- Грунин К. Я. 1958. К биологии *Oestromyia marmotae* Ged. (Diptera, Hypodermatidae) подкожного овода длиннохвостого сурка. Энтомол. обозр., 36 (4) : 883—887.
- Курчиков Н. М. 1951а. Патоморфология при заражении личинками кожного овода *H. bovis* крупного рогатого скота. Сб. научн. тр. Ленингр. инст. усовершенств. вет. врачей, 7 : 39—46.
- Курчиков Н. М. 1951б. Пути миграции личинок кожного овода *Hypoderma bovis* в организме крупного рогатого скота. Сб. научн. тр. Ленингр. инст. усовершенств. вет. врачей, 7 : 33—38.
- Лутта А. С. 1957. О борьбе со взрослым оводом крупного рогатого скота. Ветеринария, 3 : 63—66.
- Петров Д. 1966. Върху биологията на *Hypoderma bovis* De Geer. Ветеринарно-медицински науки, 2 (5) : 499—505.
- Ромашева Л. Ф. 1957. Сроки развития кожных оводов крупного рогатого скота в Киргизии и новые данные о их биологии. Тр. Киргизск. н.-иссл. инст. животноводства и ветеринарии, 13 : 69—78.
- Beesley W. N. and Davies S. F. M. 1959. The implantation of first instar larvae of *Hypoderma* into experimental animals. Veter. Rec., 71 (2) : 21—23.
- Khan M. A., Connell R. and Darcel C. le Q. 1960. Immunization and parental chemotherapy for the control of cattle grubs *Hypoderma lineatum* (De Vill.) and *H. bovis* (L.) in cattle. Canad. J. Compar. Med., 24 (6) : 177—180.
- Nelson D. L. 1963. The immune phenomena of *Hypoderma* species. Dissert. Abstr., 24 (4) : 1762—1763.
- Sergent E. et Sergent E. 1950. Etudes sur le varron du boeuf en Algerie. Essais de traitement et de vaccination. Arch. Inst. Pasteur d'Algerie, 28 (3) : 255—321.
- Weintraub J. 1961. Inducing mating and oviposition of the warble-flies *Hypoderma bovis* (L.) and *H. lineatum* (De Vill.) (Diptera, Oestridae) in captivity. Canad. Entomol., 93 (2) : 149—156.
- Weintraub J., McGregor W. S., Brundrett H. M. 1961. Artificial infestations of the northern cattle grub, *Hypoderma bovis*, in Texas. J. Econ. Entomol., 54 (1) : 84—87.

SEROLOGICAL REACTIONS IN GUINEA-PIGS TO LARVAE AND LARVAL EXTRACTS OF OEDEMAGENA TARANDI L. AND HYPODERMA BOVIS DE GEER

W. N. Beesley and K. A. Breyev

S U M M A R Y

Starting with third instar larvae from reindeer and cattle, adult flies of *Oedemagena tarandi* L. and *Hypoderma bovis* De Geer were cultured and mated in the laboratory. Eggs were laid and developed successfully. First instar larvae were implanted subcutaneously into guinea-pigs. Haemolymph from the third instar larvae was injected into other guinea-pigs. Sera from injected, but not implanted, guinea-pigs reacted against third instar haemolymph, and there was a strong cross-reaction between *O. tarandi* and *H. bovis*, indicating a close phylogenetic affinity. No serological cross-reaction was obtained with serum from a guinea-pig injected with haemolymph from larvae of *Cephenomyia trompe* M. None of the implanted larvae survived more than about one week. Possible reasons for this are discussed in the light of previous studies on the implantation of other first instar larvae into rabbits.